

## Caractérisation chimique et olfactive des chémotypes de l'espèce endémique malgache *Ravensara aromatica*

Auteur (s) : C. Menut<sup>1</sup>, H. Andrianoelisoa<sup>2</sup>, G. Chaix<sup>3</sup>, P. Danthu<sup>4</sup>

1 IBMM, Ecole Nationale Supérieure Chimie Montpellier, 8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex 5

2 FOFIFA Département de Recherches Forestières et Piscicoles, Antananarivo, Madagascar

3 CIRAD, BIOS Département, TA B-40/16, 73 rue J-François Breton, 34398 Montpellier Cedex 5

4 CIRAD Madagascar, UPR 105, URP Forêts et Biodiversité, Antananarivo, Madagascar

---

Cette étude a été entreprise pour clarifier les conditions d'exploitation de cette espèce endémique malgache, dans une démarche de maîtrise de la qualité de son huile essentielle mais également d'une gestion durable de l'espèce. Les résultats présentés, qui portent sur la variabilité chimique des huiles essentielles de *Ravensara aromatica*, constituent une partie du travail de thèse de Mme Andrianoelisoa.

### Résumé

Les résultats présentés portent sur la variabilité chimique des huiles essentielles de *Ravensara aromatica*. Cette étude a été entreprise pour clarifier les conditions d'exploitation de cette espèce endémique malgache, dans une démarche de maîtrise de la qualité de son huile essentielle mais également d'une gestion durable de l'espèce.

L'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles issues des feuilles et écorces (et dans quelques cas des racines et des tiges) a été réalisée sur 316 individus répartis sur 7 sites localisés dans le bloc forestier de moyenne altitude de l'Est de Madagascar (Corridor de Mantadia-Zahamena) et sur 3 sites du couloir d'Anjozorobe-Angavo, qui constitue l'un des derniers vestiges de forêts naturelles des hautes terres centrales malgaches.

L'impact de différents facteurs (conditions de séchage et de distillation du matériel végétal, date de récolte, origine géographique) sur cette variabilité a été exploré. Les données chimiques relatives aux huiles essentielles des feuilles, obtenues par analyse chromatographique en phase gazeuse et CPG/SM, ont été traitées par une combinaison de plusieurs méthodes statistiques. Les résultats indiquent clairement l'existence de trois chémotypes, dominés respectivement par le méthyl chavicol, le méthyl eugénol ou des structures monoterpéniques ; dans le dernier groupe d'individus, trois classes chimiques se singularisent, caractérisées par des taux élevés de sabinène,  $\alpha$ -terpinène ou limonène. Quel que soit le chémotype identifié à partir des caractéristiques chimiques des feuilles, les écorces fournissent toujours une huile essentielle riche en méthyl chavicol. La similitude des profils chimiques obtenus à partir des feuilles et des tiges justifie l'hydrodistillation des branches du *Ravensara* sans tri préalable. Une cartographie précise des individus, réalisée sur trois sites du Corridor de Mantadia-Zahamena, indique une répartition des chémotypes sur l'ensemble des sites.

L'évaluation olfactive des huiles essentielles GC/olfactométrie ouvre des perspectives d'application de l'olfaction directe comme critère de caractérisation des chémotypes sur le terrain.

Les potentialités de l'utilisation de la spectroscopie en proche infra-rouge sur le matériel végétal et/ou son huile essentielle pour un classement chimique ont également été évaluées ; les résultats obtenus font l'objet d'une communication distincte.

## Abstract

*Ravensara aromatica* is an endemic species which produces essential oils with high variability. This chemical variability within this species was investigated by gas chromatography coupled with mass spectrometry on essential oil samples obtained from 316 separated trees from seven forested areas located in the East part of Madagascar.

The effect of various factors on this variability was examined: conditions of distillation, drying of plant material, date of harvest, part of the plant or geographical origin. Statistical analyses (PCA, Clustering, FDA) of the data allowed classification of leaf essential oils into three chemotypes dominated by methyl chavicol, methyl eugenol or terpenes; in this last group, distinction of three sub-groups characterized by sabinene,  $\alpha$ -terpinene or limonene could be distinguished. In all cases, the barks always provide an essential oil rich in methyl chavicol.

Olfactive tests performed on essential oils representative of each chemotype point out their possible discrimination during the plant material collection.

The data are likely to be used as a basis for a sustainable development of the species *Ravensara aromatica*.

## Présentation de l'espèce: *Ravensara aromatica*

*Ravensara aromatica* Sonnerat, de la famille des Lauracées, est un arbre endémique des forêts sempervirentes et humides de l'est de Madagascar.

Au fil des temps, cette espèce découverte par Flacourt en 1564 a connu plusieurs dénominations. Elle a été d'abord appelée Voaravendsara par ce dernier. En 1782 Sonnerat l'a baptisée *Ravensara aromatica*. Désignée par *Agathophyllum aromaticum* Willd en 1789, cette appellation est devenue *Evodia ravensara* Gaertn en 1791, changée en *Evodia aromatica* Poir. en 1804 puis redevenue *Agathophyllum ravensara* Mirbel en 1806. Appelée *Laurus aromatica* Baillon en 1870, elle est devenue *Ravensara anisata* Danguy en 1920. Kostermans (1950) l'a renommée *Cryptocarya aromatica*. Cette dénomination a été reprise par Shatz en 2001. En 1998, Van der Werff propose le terme *Cryptocarya* à la place de *Ravensara*. Récemment en juin 2008, il persiste et la décrit comme *Cryptocarya agatophylla*. De nos jours, elle est encore connue par son nom d'origine et usuel « *Ravensara aromatica* Sonnerat » (Boiteau P., 1997).

Dans la forêt, le *Ravensara aromatica* est facilement distinguée d'une autre espèce de la même famille : le *Ravensara thouvenotii* (Tavolomanitra) par ses caractères particuliers : son écorce est plutôt lisse et de couleur irrégulière tandis que celle de *Ravensara thouvenotii* est légèrement striée. En cas de doute sur la reconnaissance de l'espèce par ce critère immédiat, si on pratique une petite entaille sur le tronc de l'arbre, une forte odeur d'anis se dégage de l'écorce, caractéristique du *Ravensara aromatica*, d'où son nom malgache: Hazomanitra (Hazo: arbre; manitra: sent bon). Cette espèce peut atteindre une hauteur de fût de 30 m ; le diamètre à hauteur de poitrine varie suivant l'âge et peut dépasser 1 mètre.

Cette espèce ne subsiste que dans les forêts denses humides de moyenne altitude de 1000 à 1400 m d'altitude. Elle nécessite un climat chaud et humide caractérisé par une pluviométrie moyenne annuelle de 1600 mm et une température moyenne annuelle de 18 à 24°C.

Les caractéristiques du substrat de *Ravensara aromatica* varient selon la localisation. La texture du sol est argileuse et latéritique dans les plateaux hydromorphes des bas-fonds forestiers, argilo-sableux dans les régions à moindre altitude avoisinant les côtes. La perméabilité est moyenne et le drainage varie de moyen à bon.

Elle se caractérise par des feuilles persistantes, la floraison allant d'octobre à janvier et la fructification intervenant de janvier à juillet. La régénération de l'espèce se fait naturellement par graines sans intervention sylvicole. En effet, on rencontre souvent des plantules aux alentours d'une plante mère (3 à 8m). A part les régénérations naturelles issues de graines, le *Ravensara aromatica* émet également des régénérations sous forme de drageons. Ces derniers sont fréquents après une opération de brûlage. En effet, les arbres touchés par les feux ne sont plus capables d'émettre de rejets, par contre le développement des drageons autour des pieds brûlés est remarquable (plus de 5 tiges par pied).

## **Exploitation de l'espèce *Ravensara aromatica***

Localement, cette plante a une valeur sociale importante car les paysans lui attribuent des vertus curatives des maux du corps et également de l'esprit.

L'utilisation traditionnelle du *Ravensara aromatica* est plutôt réservée à la médecine. En effet, feuilles et/ou écorces sont prescrites en cas de maux de tête, maux de ventre, grippe, rougeole et parfois même de maladie stomacique (Boiteau P., 1986, Rabesa Z., 1986). L'écorce sert également de fortifiant et stimulant et les feuilles de fébrifuge (Pernet R. et Meyer G., 1957).

De nos jours les autochtones n'utilisent que l'écorce bien que les feuilles soient également mentionnées dans la littérature. Cette utilisation restreinte aux écorces est probablement due à la variabilité de la composition chimique des feuilles que les utilisateurs ont du remarquer, avec une efficacité aléatoire du traitement. L'écorce est ainsi employée pour guérir les maux de tête et les fièvres, pour la cicatrisation rapide des plaies et enfin pour apaiser les maux de ventre.

D'après Lecompte (Kostermans, 1950), son bois n'est employé ni dans la menuiserie ni dans la charpenterie. Heckel dans ce même ouvrage stipule que les écorces sont utilisées pour parfumer le rhum local.

La valorisation actuelle de cette espèce aromatique est l'extraction d'huile essentielle principalement à partir de ses feuilles. Depuis une dizaine d'années, les huiles essentielles du *R. aromatica* sont commercialisées dans plusieurs pays européens et aux Etats-Unis. Dans la région où l'on l'exploite cette espèce, la collecte de feuilles s'avère la première source de revenus des riverains qui abandonnent l'agriculture au détriment de la collecte de feuilles.

L'exploitation de cette espèce pour la production d'huiles essentielles se fait en général par abattage des arbres. Cette espèce est alors menacée de surexploitation et risque de connaître le même sort que le " Kotofy " ou *Prunus africana* (exploitation sauvage) si aucune mesure n'est prise. Actuellement l'espèce *R. aromatica* ne bénéficie officiellement d'aucun statut de protection. Elle n'est mentionnée ni dans la convention CITES, ni dans la liste rouge de l'IUCN. Heureusement, cette espèce peut se reproduire par recépage, par régénération naturelle ou par bouturage.

Recépage : Le *Ravensara aromatica* est une espèce qui a une grande capacité à émettre de rejets de souche.

Les travaux menés par l'équipe de l'URP (Rakotoniaina, 2004) ont montré que :

- les individus du *R. aromatica* coupés au ras du sol développent plus de rejets de souche que ceux coupés à hauteur de poitrine.
- la croissance et la vigueur des rejets sont proportionnelles au diamètre de souche.

#### Bouturage

L'étude de faisabilité de bouturage de *R. aromatica* a été effectuée par l'URP forêts et biodiversité. Bien que le taux de survie des boutures soit assez bas, le bouturage est viable à condition de respecter certaines conditions opératoires.

Les feuilles (et les écorces) de cette espèce sont distillées pour produire des huiles essentielles utilisées en aromathérapie dans les pays du Nord. Toutefois, la composition des huiles de *R. aromatica* présente une grande variabilité qui a été à l'origine de travaux présentant des résultats divergents (Tucker *et al.*, 1995 ; Möllenbeck *et al.*, 1997 ; Théron *et al.*, 1994 ; Behra *et al.*, 2005 ; Ramanoelina *et al.*, 2006 ....).

Outre cette variabilité, qui laisse supposer l'existence de chémotypes au sein de l'espèce, une autre source de confusion vient de la désignation commerciale de l'huile essentielle de *Cinnamomum camphora* dont le nom malgache est « Ravintsara » et dont la composition chimique est caractérisée par un taux élevé de 1,8-cinéole.

Cette variabilité chimique et la confusion possible entre espèces botaniques a été confirmée par les résultats de notre étude de 20 échantillons commerciaux d'huiles essentielles étiquetés *Ravensara aromatica* (publication en cours) : l'analyse de leurs compositions chimiques a montré que 12 d'entre eux étaient en réalité issus de *Cinnamomum camphora* (riches en 1,8-cinéole) tandis que les 8 autres, authentifiés comme des huiles essentielles de *Ravensara aromatica*, pouvaient être regroupés en 4 classes chimiques caractéristiques qui seront décrites en détails ci-après.

### **Notre étude de la variabilité chimique du *Ravensara aromatica***

L'étude porte 316 individus répartis sur 10 sites de collecte :

- 7** dans le Corridor de Mantadia-Zahamena : forêt dense humide sempervirente du bloc forestier de moyenne altitude de l'Est ;
- 3** dans le Couloir d' Anjozorobe-Angavo : un des derniers vestiges de forêts naturelles des hautes terres centrales malgaches, caractérisé par une richesse exceptionnelle en biodiversité (500 espèces végétales répertoriées)

Deux types d'étude ont été réalisés :

- Analyse chimique par chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des huiles essentielles des feuilles et des écorces (550 échantillons)

- Investigation sur le matériel végétal et sur les huiles essentielles en Proche Infra-Rouge (NIRS) (cette partie fera l'objet d'une communication séparée)

Dans tous les cas, un traitement statistique des données a été appliqué pour mettre en évidence la corrélation entre les deux méthodes et évaluer leurs potentialités respectives dans la caractérisation des différents chémotypes du *Ravensara*.

## Etude chimique des huiles essentielles du *Ravensara aromatica*

L'impact de différents facteurs (conditions de séchage et de distillation du matériel végétal, date de récolte, origine géographique) sur cette variabilité a été exploré.

### Méthodologie

Les huiles essentielles ont été obtenues par traitement de 200-400g de matériel végétal après une hydrodistillation de 3H.

Les données chimiques relatives aux huiles essentielles des feuilles, obtenues par analyse chromatographique en phase gazeuse et CPG/SM, ont été traitées par une combinaison de plusieurs méthodes statistiques : une analyse en composantes principales (ACP) qui permet de rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre les n variables aléatoires. Les données issues de l'ACP ont été soumises à une classification automatique hiérarchique (CAH) utilisant comme variables les k nouvelles composantes principales obtenues lors de l'ACP (obtention d'un dendrogramme); les classes obtenues ont été stabilisées par une classification K-means; l'étude de la différence entre les classes étant enfin réalisée par une analyse factorielle discriminante (AFD) qui permet d'optimiser la représentation en donnant une image plus claire de la dispersion des classes.

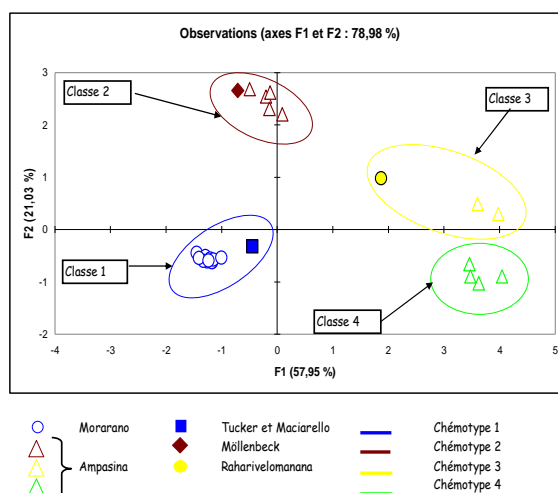
### Résultats

Les résultats indiquent clairement l'existence de **3 chémotypes**, dominés respectivement par le **méthyl chavicol**, le **méthyl eugénol** ou **des structures monoterpéniques** ; dans le dernier groupe d'individus, **3** classes chimiques se singularisent, caractérisées par des taux élevés de **sabinène**,  **$\alpha$ -terpinène** ou **limonène**. Quel que soit le chémotype identifié à partir des caractéristiques chimiques des feuilles, les écorces fournissent toujours une huile essentielle riche en **méthyl chavicol** (Andrianoelisoa *et al.*, 2006, 2010).

Des exemples particuliers sont donnés pour illustrer les résultats de l'étude :

- **Etude menée sur des individus des Forêts d'Ampasina et de Morarano :**

Etude des feuilles de 28 individus ; 41 composés identifiés dans leurs huiles essentielles ; 4 profils chimiques caractéristiques dominés respectivement par le méthyl chavicol, le méthyl eugénol, l' $\alpha$ -terpinène et le sabinène. L'analyse statistique des résultats obtenus sur ces 28 individus et intégrant ceux de la littérature confirme la distinction de ces 4 groupes chimiques.



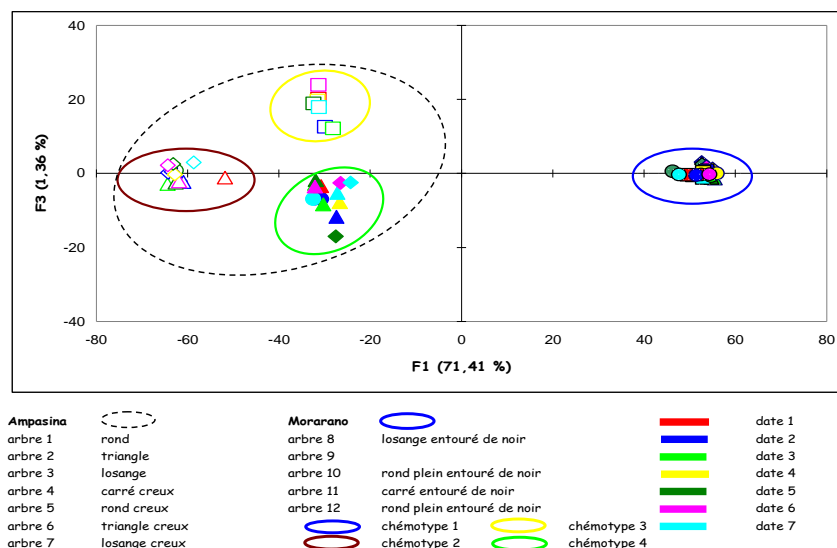
Chémotype 1 à méthyl chavicol  
Chémotype 3 à  $\alpha$ -terpinène

Chémotype 2 à méthyl eugénol  
Chémotype 4 à sabinène

- **Etude de la « stabilité » chimique des chémotypes**

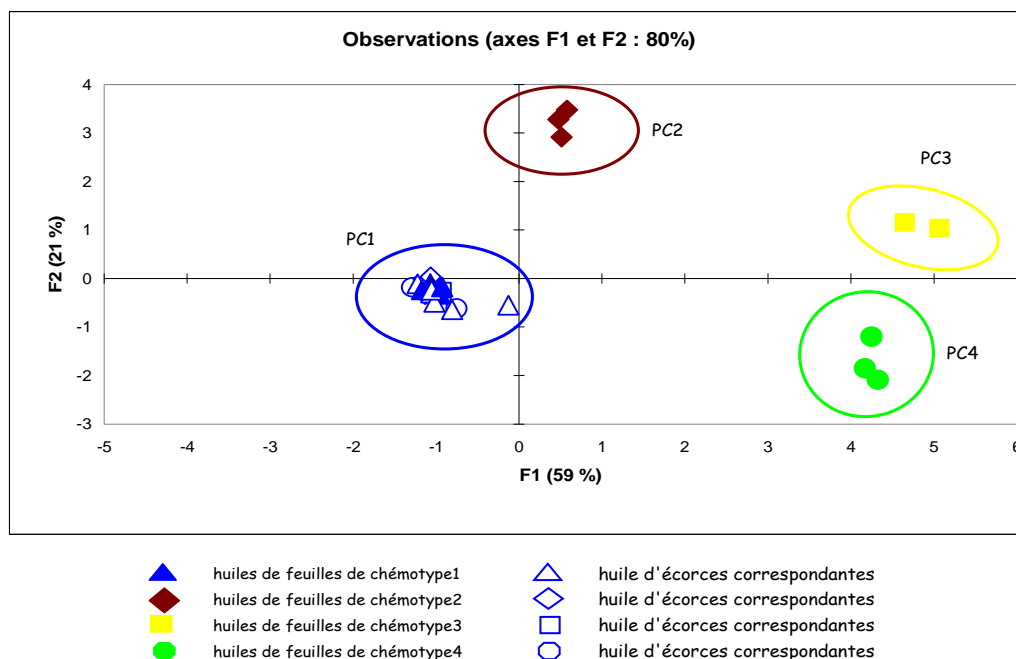
Facteurs de variabilité examinés : conditions de distillation, temps de séchage des feuilles, influence de la date de récolte : pas de changements majeurs sur les molécules discriminantes.

- Illustration par les résultats obtenus sur **12 arbres et 7 dates de récolte** qui montrent pour chacun des chémotypes une grande stabilité du profil chimique quelle que soit la période de récolte (étude réalisée sur les sites d'Ampasina et de Morarano).

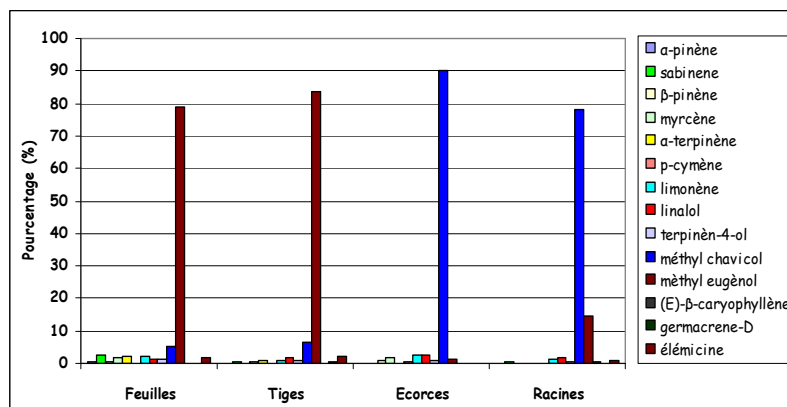


- **Influence de la partie de la plante traitée**

Quel que soit le classement chimique obtenu sur la base de l'étude des feuilles, l'huile essentielle de l'écorce est dominée par le méthyl chavicol (odeur anisée) et se classe donc dans le groupe 1 (étude réalisée sur 16 arbres des forêts d'Ampasina et de Morarano).

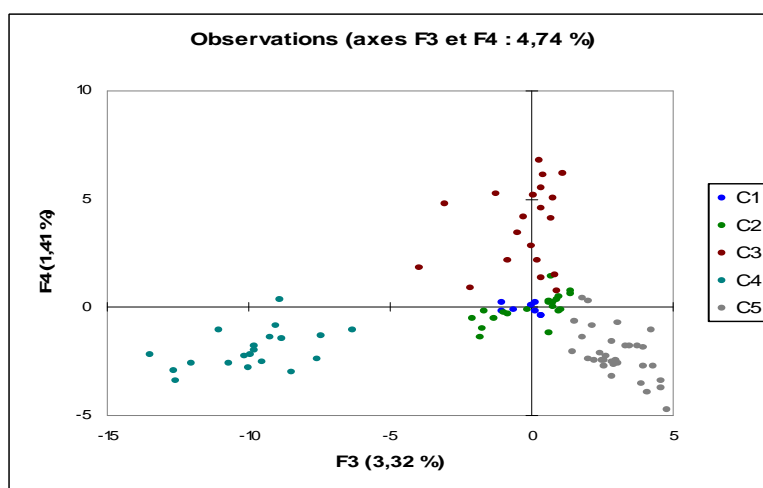
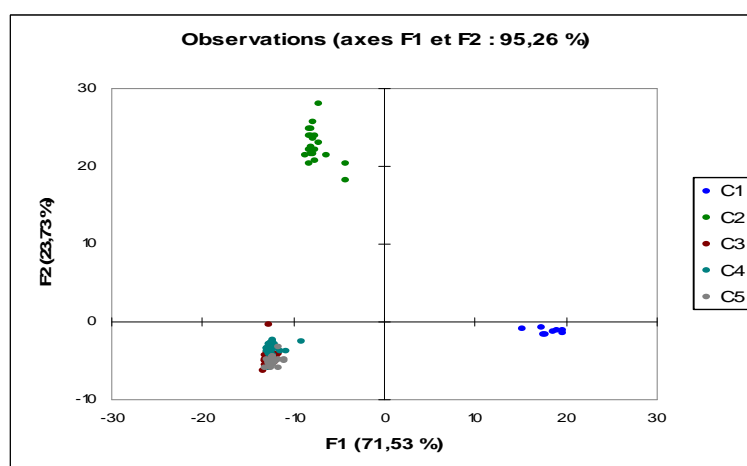


L'étude des huiles essentielles obtenues à partir des écorces, des racines, des feuilles et des tiges montre une similitude écorces/racines et feuilles/tiges (illustration pour un individu de chémotype 2 à méthyl eugénol ; d'où la possibilité de distiller les branches entières sans tri préalable des feuilles.



## Bilan

Classification des 316 individus examinés sur la base des caractéristiques chimiques de leurs huiles essentielles en 3 classes chimiques dans le plan F1/F2 (méthyl chavicol, méthyl eugénol et terpènes) ce dernier groupe pouvant être scindé en 3 autres classes chimiques selon F3/F4 (α-terpinène, sabinène et un nouveau groupe dominé par le limonène).



Une cartographie précise des individus, réalisée sur trois sites du Corridor de Mantadia-Zahamena (Raboana, Anosibé An'la et Didy), indique une répartition des différents chémotypes sur l'ensemble des sites.

L'évaluation olfactive des huiles essentielles de ces chémotypes par GC/olfactométrie (Méthode AEDA) ouvre des perspectives d'application de l'olfaction directe comme critère de caractérisation sur le terrain.

## Conclusion

- Cinq chémotypes répertoriés après validation par analyse statistique.
- Démonstration de la stabilité de ces chémotypes au cours de l'année et d'une génération à l'autre (**repérage des individus**)
- Similarité des huiles essentielles tiges/feuilles (distillation des rameaux possible)
- Similarité des huiles essentielles écorces/racines (dominées par le méthyl chavicol)
- Sélection olfactive envisageable au ramassage (nécessite l'entraînement des collecteurs)

*Quelle place pour la spectroscopie proche infrarouge comme outil de contrôle du *Ravensara aromatica* pour une détermination précoce et rapide des chémotypes?*

## Bibliographie

Andrianoelisoa H.S., Menut C., Collas de Chatelperron P., Saracco J., Ramanoelina P., Danthu P. *Intraspecific chemical variability and highlighting of chemotypes of leaf essential oils from Ravensara aromatica Sonnerat, a tree endemic to Madagascar*. Flav. Frag. J., **2006**, 21, 833-838.

Andrianoelisoa H.S., Menut C., Collas de Chatelperron P., Ramanoelina P., Raobelison F., Danthu P. Chemical composition of essential oils in bark and leaves of individual trees of *Ravensara aromatica*. J. Ess. Oil Res., **2010** ; 22, 66-70.

Berha O., Rakotoarison C., Rhiannon H., Ravintsara vs Ravensara. A taxonomic clarification, Int. J. Aromather., **2001**, 11, 4-7.

Boiteau P. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Précis de matière médicale malgache. **1986**, p 22 ; 44 ; 76 ; 81.

Boiteau P., Boiteau M., Allorge-Boiteau L. Index des noms scientifiques avec leurs équivalents malgaches (extrait du Dictionnaire des noms malgaches de végétaux), Collection « Nature » : Flore de Madagascar, Edition Alzieu, **1997**, vol 1.

Kostermans A.J.G.H. La flore de Madagascar et des Comores, 81<sup>e</sup> famille. Lauracées, Edit. Didot F., Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, **1950**, pp 46-52.

Möllenbeck S., König T., Shreier P., Schwab W., Rajaonarivony J., Ranarivelo L. Chemical composition and analyses of enantiomers of essential oils from Madagascar. Flavour Frag. J., **1997**, 12, 63-69.

Pernet R., Meyer G. Pharmacopée de Madagascar ; Publication de l'Institut de Recherches, Tananarive-Tsimbazaza, **1957**, p 50 ; 65.



Rabesa Z. Pharmacopée de l'Alaotra, **1986**, p 13.

Rakotoniaina H. Etude de la dynamique de la reconstitution foliaire et des potentialités en huiles essentielles de l'espèce *Ravensara aromatica* Sonnerat en vue d'une gestion durable, Mémoire d'ingénieur en Agronomie option Eaux et Forêts, ESSA, Université d'Antananarivo, **2004**.

Ramanoelina P.A.R., Rasoarahona J.R.E. Chemical Composition of *Ravensara aromatica* Sonn. Leaf essential oils from Madagascar. J. Essent. Oil Res., **2006**; 18, 215-217.

Théron E., Holeman M., Potin-Gautier M., Pinel R. Authentication of *Ravensara aromatica* and *Ravensara anisata*. Planta Medica, **1994**, 60, 489-491.

Tucker A.O., Maciarelo M.J. Two commercial oils of *Ravensara* from Madagascar: *R. anisata* and *R. aromatica* Sonn. (Lauraceae). J. Essent. Oil Res., **1995**, 7, 327-328.